



食用油脂における脂肪酸結合位置の分析法に関する研究

著者	吉永 和明
号	52
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農第795号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00122793

よしなが かずあき

氏 名（本 籍 地） 吉 永 和 明

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農第 795 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 27 年 11 月 12 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項

論 文 題 目 食用油脂における脂肪酸結合位置の分析法に関する研究

博士論文審査委員 （主査）教 授 齋藤 忠夫

教 授 駒井 三千夫

教 授 池田 郁男

博士論文内容要旨

食用油脂における脂肪酸結合位置の
分析法に関する研究

月島食品工業株式会社 研究所

吉永 和明

指導教員 齋藤 忠夫 教授

第一章 緒言

食用油脂の主成分であるトリアシルグリセロール (TAG) は、グリセロールの3箇所の水酸基に3つの脂肪酸がそれぞれエステル結合した化学構造を有している (Fig.1.1)。TAGにおける脂肪酸の結合位置は、Fischerの投影図に基づいた立体特異的番号によって *sn*-1、*sn*-2、*sn*-3 位と区別される。また、単純にグリセロールの両脇の水酸基を α 位、中心の水酸基を β 位とも定義されている。TAGに結合する脂肪酸の結合位置は、ランダムではなく、生物種によって異なる。例えば、魚油や海獣油は、様々な保健機能を有するエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの *n*-3 系高度不飽和脂肪酸 (*n*-3HUFA) を含有しているが、魚油の *n*-3HUFA は TAG の *sn*-2 位に多く、海獣油の *n*-3HUFA は TAG の *sn*-1,3 位に多く結合する。近年では、これらの結合位置の違いが、*n*-3HUFA の機能性に大きな影響を及ぼすことが数々の研究によって明らかになってきた。しかしながら、このような研究は、魚油と海獣油を直接比較したものが多く、これらの結果から、個々の EPA および DHA の生理機能が TAG 結合位置により、どのような影響を受けるのかを結論付けるのは困難である。また、現在までに行われてきた脂肪酸の結合位置と脂質代謝の関係性を調査した数々の研究は、人体に良い効果をもたらす *n*-3HUFA について研究が進んでいるが、人体に悪影響を及ぼすと言われるトランス (型) 脂肪酸が TAG のどの位置に結合しているのかを精査した研究例は少ないといった問題点もあった。

トランス脂肪酸は、部分水素添加油 (部分水添油) やウシなどの反芻動物由来の油脂に含まれており、近年、部分水添油由来のトランス脂肪酸の過剰摂取は、心疾患のリスクを高めることが数多くの疫学研究や介入試験によって明らかになってきた。しかしながら、これらの研究は、部分水添油と乳脂肪を直接

比較したものが多く、食用油脂に数多く存在するトランス脂肪酸の位置異性体 (Fig. 1.2) のうち、どの異性体が人体に悪影響を及ぼすのかを評価した結果ではない。このようにトランス脂肪酸の研究が進まない原因として、従来のトランス脂肪酸分析法では、食用油脂に含まれる数多くの位置異性体の分離・定量が困難であることが挙げられる。

上記の研究を進めるためには、まず TAG に結合した脂肪酸の種類や結合位置を正確に分析する必要がある。一般に、油脂の脂肪酸組成は、ガスクロマトグラフ-水素炎イオン化検出器 (GC-FID) によって分析されている。GC-FID に使用される分析カラムは、様々な種類が販売されており、分析対象によって使い分けられている。近年では、技術力の進展により、従来の分析カラムよりも優れた性能を持つカラムが開発されてきている。現在までに、数多くの研究者が、食用油脂に含まれる様々な種類の脂肪酸種を分離・定量する方法を検討してきたが、トランス脂肪酸のように数多くの異性体を持つ脂肪酸を分離することは困難であった。一方、TAG における脂肪酸の結合位置の分析には、酵素 (リパーゼ) を用いた手法が広く用いられている。これは、酵素が TAG の *sn*-1,3 位に結合する脂肪酸を選択的に加水分解する特性を利用した方法であり、これによって、TAG の *sn*-1,3 位と *sn*-2 位の脂肪酸組成を分析することができる。これらの手法を用いて、乳脂肪の TAG におけるトランス脂肪酸の結合位置について調査した研究がいくつか報告されているが、前述のとおり、トランス脂肪酸異性体を分離・定量する手法が確立されていないため、乳脂肪 TAG におけるトランス脂肪酸異性体の結合位置については不明な点が多い。このように、油脂を構成する脂肪酸の種類およびそれらの TAG 結合位置に関する研究は、解決すべきいくつかの問題点を残していた。そこで本研究では、従来の TAG 解析での種々の問題点を解決する新しい分析法の構築とその応用について研究を行った。

第二章 トリアシルグリセロールにおける n-3 系高度不飽和脂肪酸の結合位置と生理機能

【目的】

TAG における結合位置ごとの n-3HUFA の生理機能を調査した過去の研究は、魚油と海獣油を比較したものが多く、個々の EPA または DHA の機能性がどのような影響を受けるのかを調査した研究例は少ない。本章では、TAG における EPA または DHA の結合位置が、それぞれの生理機能にどのような影響を及ぼすのかを精査するため、C57BL/6J マウスへの投与試験を行った。

【方法】

投与試験には、脂肪酸の組成は同一であるが、脂肪酸の結合位置の異なる TAG (TAG 位置異性体) を用いた (Fig. 2.1)。EPA の生理機能評価には、パルミチン酸 2 分子と EPA から構成される TAG 位置異性体ペア (β -PEP および β -PPE)、DHA の評価には、パルミチン酸 2 分子と DHA から構成される TAG 位置異性体ペア (β -PDP、 β -PPD) を用い、コントロールにはパルミチン酸 3 分子から構成される TAG (PPP) を採用した。これらの TAG を餌に混ぜ、C57BL/6J マウスに長期投与 (6 週間) を行った後、マウスの血清、肝臓の脂質濃度、ならびに脂質代謝関連酵素を測定した。

【結果と考察】

投与試験後の C57BL/6J マウスの血清および肝臓脂質濃度を Table 2.1 に示した。PPP (コントロール) 投与群と比較すると、 β -PDP (TAG の *sn*-2 位に結合した DHA) 投与群では、血清および肝臓中の TAG およびコレステロール濃度が有意に減少した。また、 β -PDP 投与による TAG およびコレステロール濃度の低下能は、 β -PPD (TAG の *sn*-1,3 位に結合した DHA) 投与群よりも高かった。一方、EPA を結合させた TAG 投与結果では、コントロール投与群と比べ、 β -PPE

(TAG の *sn*-1,3 位に結合した EPA) 投与群の肝臓コレステロール濃度が有意に減少した。

肝臓における脂質代謝関連酵素活性 (Table 2.2) の測定結果では、n-3HUFA 投与群は、コントロールと比べ、FAS、ME、G6PDH などの脂肪酸合成関連酵素活性が有意に低下した。この低下効果は、TAG における n-3HUFA の結合位置 (*sn*-1,3 位と *sn*-2 位) 間に有意な差は認められなかったが、β-PDP 投与群の FAS 活性は β-PPD 投与群よりも低下する傾向が見られた。以上のことから、TAG の *sn*-2 位に結合した DHA は、*sn*-1,3 位に結合した DHA よりも、脂肪酸合成酵素活性の低下させるため、マウス血清および肝臓中の TAG およびコレステロール濃度が減少したと考えられる。一方、EPA は、TAG の *sn*-1,3 位に結合した際に、肝臓のコレステロール濃度を有意に減少させることが判明した。これは、TAG における n-3HUFA の結合位置は、これらの生理機能に大きな影響を及ぼすことを証明する結果となった。

第三章 食用油脂中のトランス脂肪酸位置異性体の分析方法の開発

【目的】

第二章では、TAG における脂肪酸の結合位置は、脂質の生理機能に大きな影響を及ぼすことを明らかにした。本章では、TAG におけるトランス脂肪酸の結合位置を評価する前段階として、部分水添油および乳脂肪中に数多く存在するトランス脂肪酸位置異性体 (Fig. 1.2) の分析法の確立について検討した。

【方法】

シスおよびトランス脂肪酸位置異性体の分析条件を検討するために、シス型オクタデセン酸位置異性体 (*cis*-4~*cis*-16-C18:1) およびトランス型オクタデセ

ン酸位置異性体 (*trans*-4~*trans*-16-C18:1) の標準品 (Fig. 3.1) を用いた。分析カラムは、トランス脂肪酸分析公定法で指示されている分析カラムである SP-2560 と近年開発された SLB-IL111 カラムを使用し、両者の位置異性体の分離能を比較した。さらに、最適化した分析条件を用いて、部分水添植物油および乳脂肪のトランス脂肪酸分析を行った。

GC-FID 分析条件

分析カラム①: SP-2560 (100 m × 0.25 mm i.d., 0.20 μm; Sigma-Aldrich Corporation)

分析カラム②: SLB-IL111 (100 m × 0.25 mm i.d., 0.20 μm; Sigma-Aldrich Corporation)

分析温度: 120°C~180°C

【結果と考察】

従来の分析公定法で指示されている SP-2560 カラムを用いた場合では、いくつかの *cis*-C18:1 位置異性体および *trans*-C18:1 位置異性体の分離が困難であった (Fig. 3.2)。一方、SLB-IL111 カラムを用いた場合、分析温度 120°C で *cis*-C18:1 異性体 13 種類をすべて分離することができた (Fig. 3.3)。また、*trans*-C18:1 に関しても *trans*-6, 7-C18:1 ペアを除く異性体の分離が可能であった。また、*trans*-6, 7-C18:1 ペアは分析温度 160°C において部分的に分離を達成した。つまり、分析温度 120°C と 160°C を併用することで、食用油脂中のすべての *trans*-C18:1 位置異性体の分離が可能であることが判明した。

今回開発した分析条件を用いて、部分水添植物油および乳脂肪中の *trans*-C18:1 位置異性体を定量した (Fig. 3.4)。結果、従来の手法では分析不可能であった食用油脂中の *trans*-6, 7, 8-C18:1 位置異性体および *trans*-13, 14-C18:1 位置異性体の組成を明らかにすることができた。

第四章 食用油脂トリアシルグリセロールにおけるトランス脂肪酸位置異性体の結合位置の解明

【目的】

第三章では、部分水添植物油および乳脂肪に含まれるすべてのトランス脂肪酸位置異性体を分析する手法を確立した。本章では、*sn*-1,3 位特異的リパーゼを用いた *sn*-2 位脂肪酸組成分析法と第三章で確立したトランス脂肪酸分析法を併用し、食用油脂 TAG におけるトランス脂肪酸異性体の結合位置の総合的な分析法の確立について検討した。

【方法】

試料は、菜種油、部分水添菜種油、乳脂肪および牛脂を使用した。最初に、試料と *sn*-1,3 位特異的リパーゼを反応（30°C、3h）させた後、Sep-Pak Silica にて *sn*-2 画分を回収した。次に、*sn*-2 画分をメチルエステル化し、*sn*-2 位脂肪酸組成分析試料とした。トランス脂肪酸の位置異性体分析は、第三章の条件を用いた。

GC-FID 分析条件

分析カラム：SLB-IL111（100 m × 0.25 mm i.d., 0.20 μm; Sigma-Aldrich Corporation）

分析温度：120°C、160°C

【結果と考察】

食用油脂中の *trans*-C18:1 位置異性体の分布を Fig. 4.1 に示した。部分水添菜種油の主要なトランス脂肪酸は、*trans*-9-C18:1（エライジン酸）であり、次いで、*trans*-10, *trans*-8, *trans*-11-C18:1 などの異性体が含まれていた。一方、乳脂肪は、*trans*-11-C18:1 が主なトランス脂肪酸であり、牛脂では *trans*-11, *trans*-10-C18:1 が豊富に含まれていた。

総脂肪酸組成分析と *sn*-2 位脂肪酸組成分析の結果より、*trans*-C18:1 位置異性体の TAG への結合傾向を解析した結果 (Fig. 4.2)、部分水添菜種油の主なトランス脂肪酸である *trans*-9-C18:1 および *trans*-11-C18:1 は、TAG の *sn*-2 位に結合する傾向を示した。一方、乳脂肪および牛脂に多く含まれるトランス脂肪酸である *trans*-11-C18:1 および *trans*-10-C18:1 は、TAG の *sn*-1,3 位に有意に結合することが確認された。また、乳脂肪および牛脂の *trans*-C18:1 位置異性体の TAG への結合傾向は、異性体ごとに異なっていた。以上の結果より、TAG におけるトランス脂肪酸位置異性体の結合位置は、油脂の種類によって異なり、また位置異性体ごとに TAG への結合傾向が異なることが示唆された。TAG における脂肪酸の結合位置は、脂質代謝に影響を及ぼすことが第二章で明らかとなっていることから、トランス脂肪酸も TAG の結合位置によって、何らかの影響を受けると考えられる。トランス脂肪酸が人体に及ぼす影響を明らかにするため、今後、さらなる研究が求められる。

第五章 乳脂肪トリアシルグリセロールの構造と食品中の乳脂肪含有量の迅速分析方法の開発

【目的】

第三章および第四章において、部分水添油および乳脂肪に含まれるトランス脂肪酸位置異性体の分布を精査した結果、両者は各位置異性体の存在割合が異なっているが、構成するトランス脂肪酸位置異性体は同じであることが判明した。このことから、仮に食品中にトランス脂肪酸が多く含まれていた場合、これが部分水添油由来または乳脂肪由来なのかを判断し、部分水添油または乳脂肪がどの程度使用されているのかを評価することは困難であると考えられる。

本章では、乳脂肪に特徴的に含まれる TAG を指標として用いて、食品中に乳脂肪がどの程度使用されているのかを評価する方法について検討を行った。

【方法】

乳脂肪の指標として、パルミチン酸 2 分子と酪酸から構成される TAG である 1,2-Dipalmitoyl-3-butyroyl-glycerol (PPBu) を採用した (Fig. 5.1)。最初に、乳脂肪中の平均的な PPBu 含有量を LC-APCI-MS/MS にて測定した。次に、バター含有マーガリン（乳脂肪 15%使用）およびバタークッキー（乳脂肪 10%使用）中の PPBu 含有量を定量し、得られた値から製品に使用されている乳脂肪量を推定した。

LC-APCI-MS/MS 分析条件

分析カラム：Sunrise C28 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm; ChromaNik Technologies Inc.)

移動相：アセトン/アセトニトリル = 80/20 (v/v)

分析温度：15℃

【結果と考察】

本分析条件により、PPBu とその TAG 位置異性体である PBuP が分離できた (Fig. 5.2)。乳脂肪を分析した結果、乳脂肪中の PPBu 含有量の平均値は 3.9 g/100 g oil となった。バター含有マーガリンおよびバタークッキーの乳脂肪含有量を PPBu 値から推定した結果 (Table 5.1)、本分析法は、高い精度で食品中の乳脂肪含有量を推定できることが示唆された。また、乳脂肪は、PBuP をほとんど含有していないことが判明した (Fig. 5.2)。PBuP は、乳脂肪のエステル交換によって発生することから、本分析手法は、乳脂肪のエステル交換の有無を判断することも可能であると考えられる。

総括

本研究では、部分水添油や乳脂肪に含まれるトランス脂肪酸が生体に及ぼす影響を精査するうえで必要となるトランス脂肪酸位置異性体の分析法、TAG における脂肪酸結合位置の分析法、ならびに、食品中の乳脂肪含有量の測定法を構築した。これらの研究成果より、以下の知見を得た。

- ① n-3HUFA である EPA や DHA の生理機能は、TAG における結合位置により影響を受けることが判明した。
- ② 従来の分析法では分離困難であった部分水添油および乳脂肪に含まれるすべてのトランス脂肪酸位置異性体を分離・定量が可能となった。
- ③ 部分水添油の主要なトランス脂肪酸は、TAG の *sn*-2 位に結合し、乳脂肪および牛脂の主要なトランス脂肪酸は、TAG の *sn*-1,3 位に結合することが確認できた。
- ④ LC-APCI-MS/MS を用いることで、食品中の乳脂肪含有量を簡便に推定することが可能となった。

本研究で得られた知見は、真に人体に悪影響を及ぼすトランス脂肪酸位置異性体を特定し、食用油脂の安全性を保障するための重要な基盤となると考えられる。今後は、食用油脂 TAG におけるトランス脂肪酸位置異性体の分布をより詳細に解明し、TAG におけるトランス脂肪酸位置異性体の結合位置を考慮に入れた動物試験の実施が必要である。今回、構築した分析技術を利用し、油脂業界および乳業業界の発展に役立てていきたい。

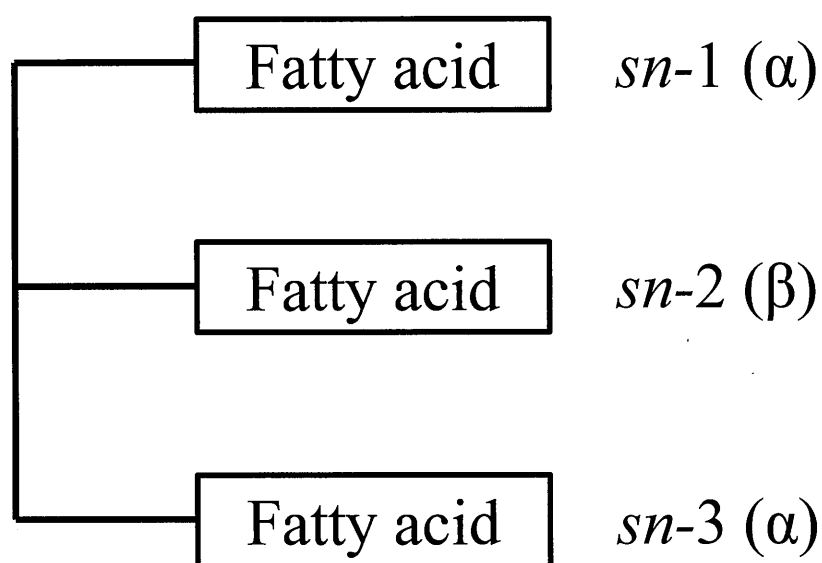


Figure 1.1
Chemical structure of triacylglycerol

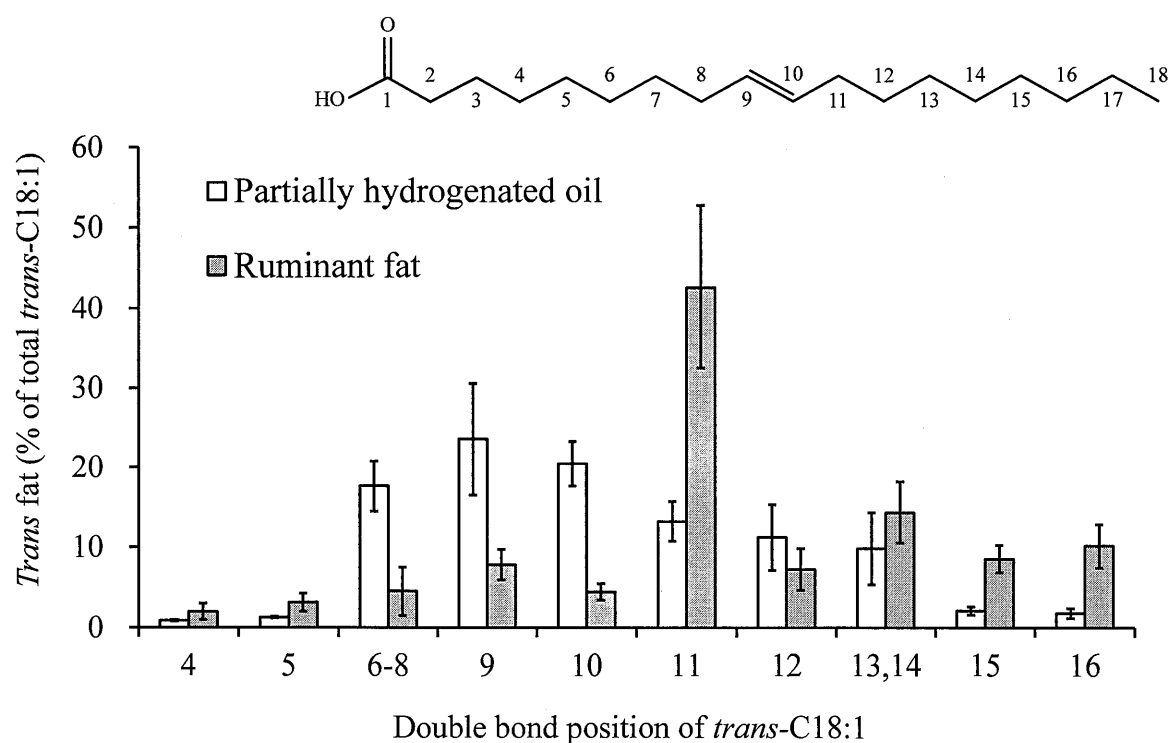


Figure 1.2
Isomeric distribution of *trans*-octadecenoic acids in edible fats and oils

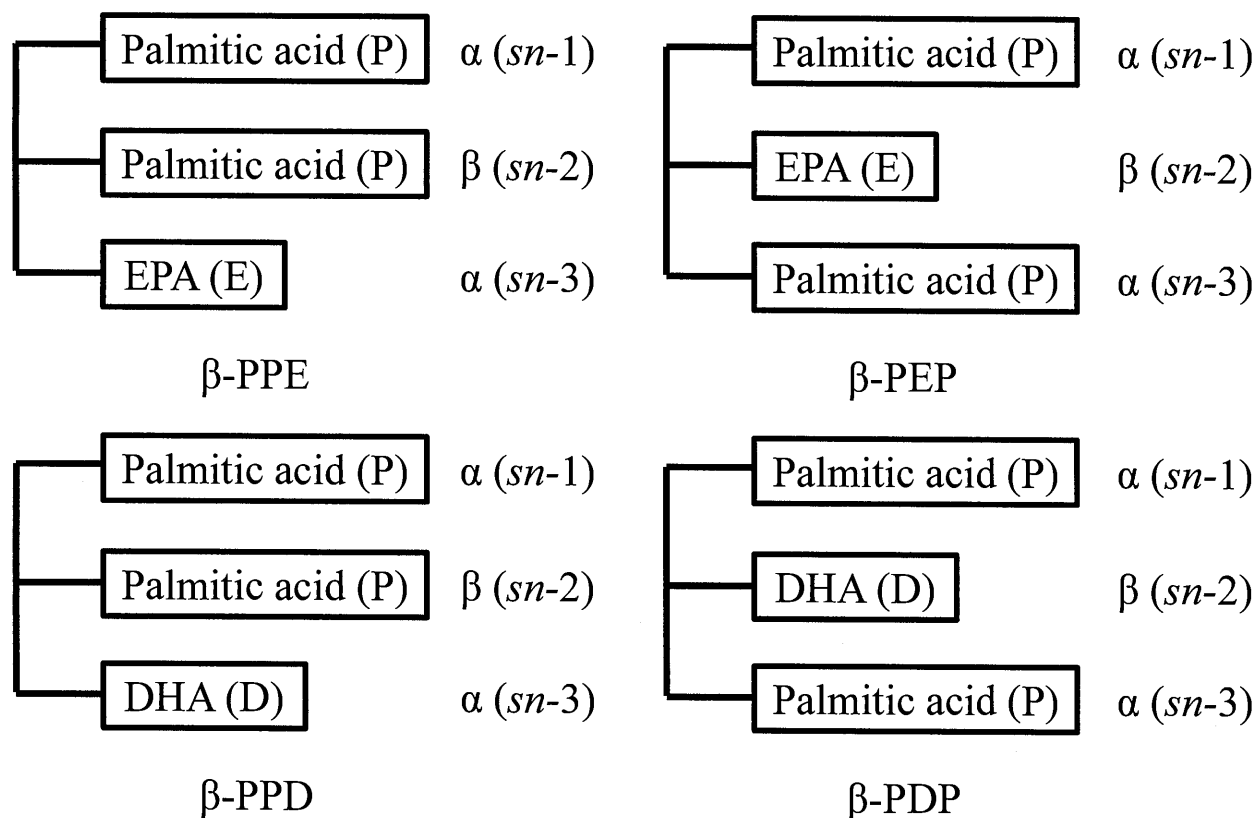


Figure 2.1
Structures of triacylglycerol positional isomers

Table 2.1
Effect of experimental diet on serum and hepatic lipid in C57BL/6J mice

	PPP	β -PPE	β -PEP	β -PPD	β -PDP
Serum lipid concentration (mg/dL)					
Triacylglycerol	106 \pm 8.0	88.8 \pm 7.5 ^{bc}	105 \pm 11.4 ^{ab}	130 \pm 10 ^a	67.6 \pm 6.0 ^{c*}
Cholesterol	126 \pm 3.0	97.2 \pm 2.0 ^{a*}	98.6 \pm 4.3 ^{a*}	94.9 \pm 4.2 ^{a*}	77.0 \pm 2.6 ^{b*}
Hepatic lipid concentration (mg/g liver)					
Triacylglycerol	88.3 \pm 7.5	85.1 \pm 8.6 ^{ab}	79.4 \pm 7.6 ^{ab}	94.3 \pm 4.7 ^a	62.5 \pm 2.5 ^{b*}
Cholesterol	4.14 \pm 0.11	3.53 \pm 0.15 [*]	3.76 \pm 0.11	3.87 \pm 0.12	3.49 \pm 0.10 [*]

Each value represents mean \pm SE of six mice. ^{abc}Different superscript letters show significant difference at $P < 0.05$. ^{*} $P < 0.05$ (control group vs. n-3HUFA group).

Table 2.2

Actives of hepatic lipogenic and lipolytic enzymes in C57BL/6J mice

	PPP	β -PPE	β -PEP	β -PPD	β -PDP
	(nmol/min mg protein)				
FAS	7.13 \pm 0.68	1.69 \pm 0.17 [*]	1.54 \pm 0.23 [*]	2.09 \pm 0.26 [*]	1.28 \pm 0.20 [*]
ME	82.4 \pm 8.5	48.2 \pm 3.1 [*]	44.2 \pm 6.7 [*]	48.5 \pm 2.4 [*]	42.0 \pm 3.4 [*]
G6PDH	8.91 \pm 1.30	3.37 \pm 0.14 [*]	3.44 \pm 0.51 [*]	3.56 \pm 0.10 [*]	2.93 \pm 0.08 [*]
CPT	5.01 \pm 0.25	5.59 \pm 0.24 ^{ab}	4.98 \pm 0.15 ^a	6.46 \pm 0.48 ^{b*}	5.80 \pm 0.18 ^{ab}

Each value represents mean \pm SE of six mice. ^{abc}Different superscript letters show significant difference at $P < 0.05$. ^{*} $P < 0.05$ (control group vs. n-3HUFA group).

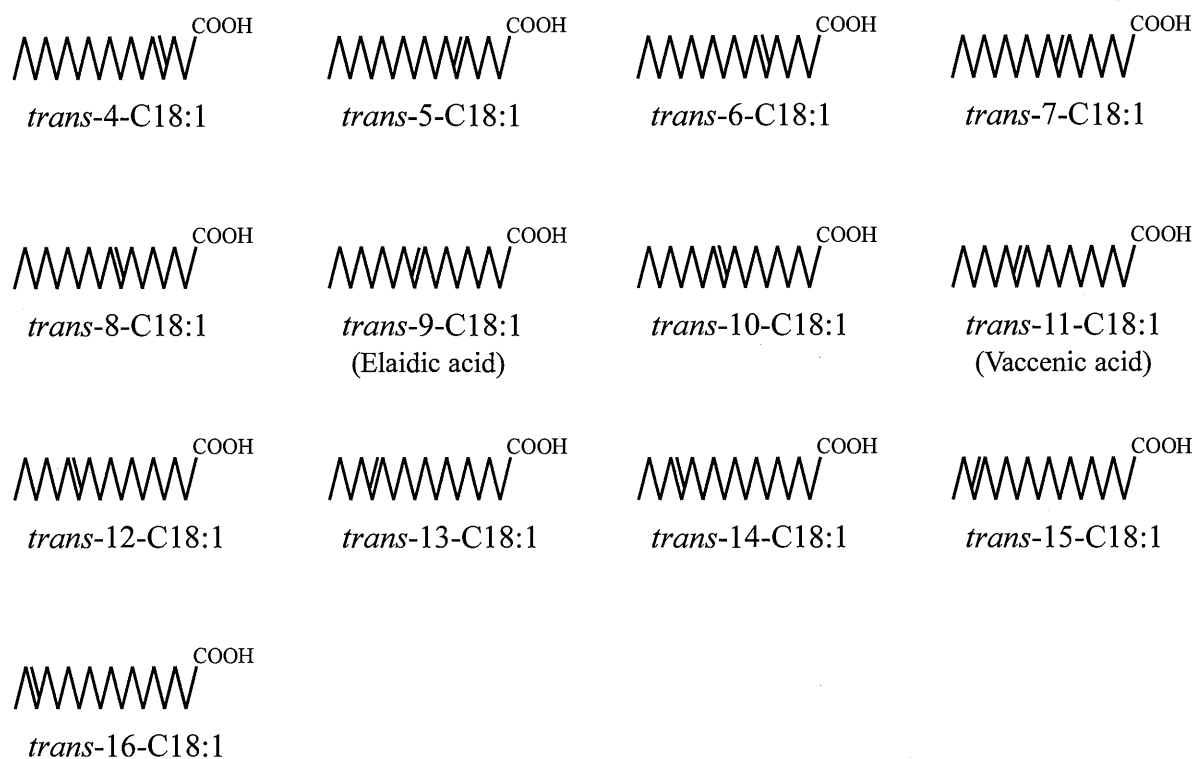


Figure 3.1

Structures of *trans*-octadecenoic acid positional isomers

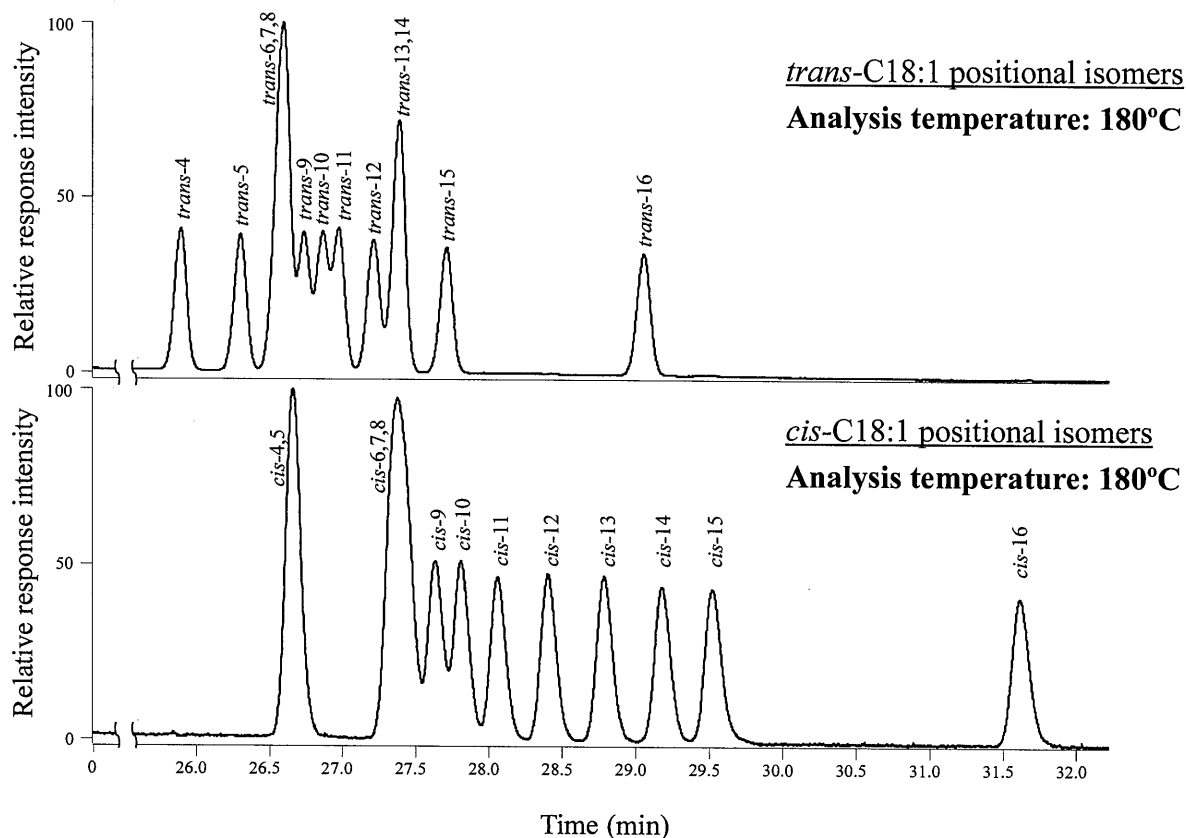


Figure 3.2
Resolution of *trans*- and *cis*-C18:1 isomers using an SP-2560 column

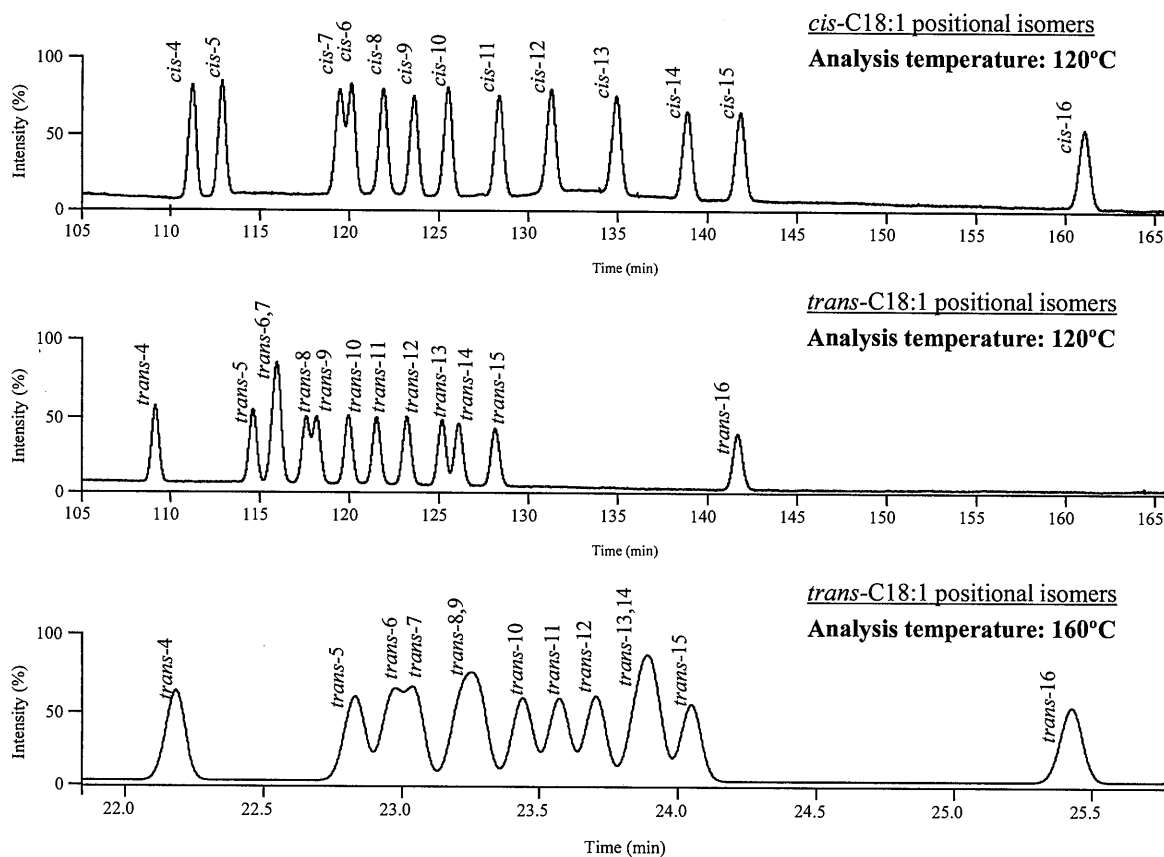


Figure 3.3
Resolution of *trans*- and *cis*-C18:1 isomers using an SLB-IL111 column

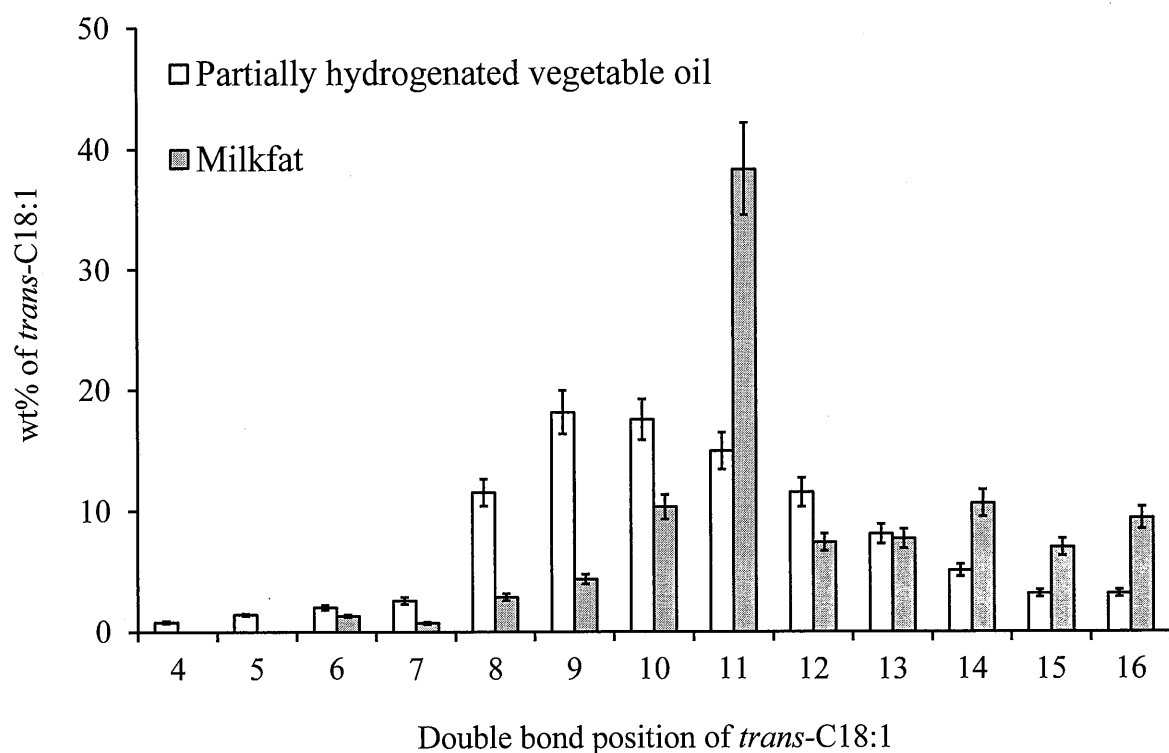


Figure 3.4
Relative proportion of *trans*-octadecenoic acids in edible fats and oils

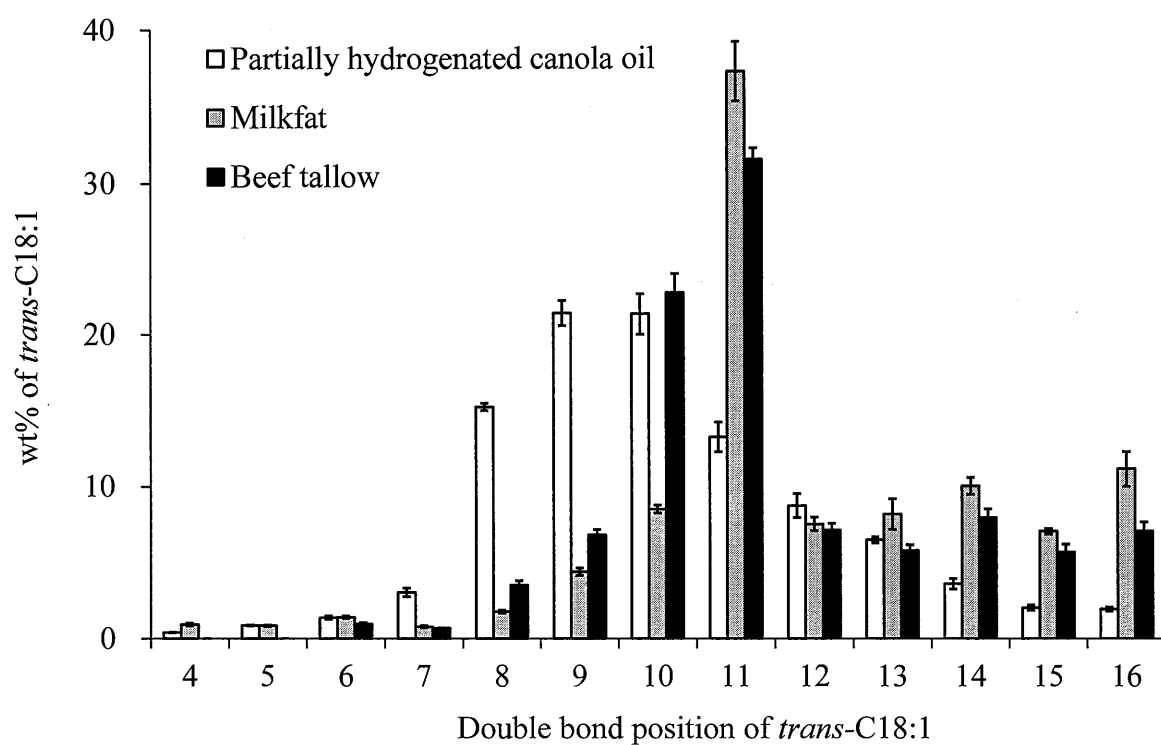


Figure 4.1
Relative proportion of *trans*-octadecenoic acids in edible fats and oils

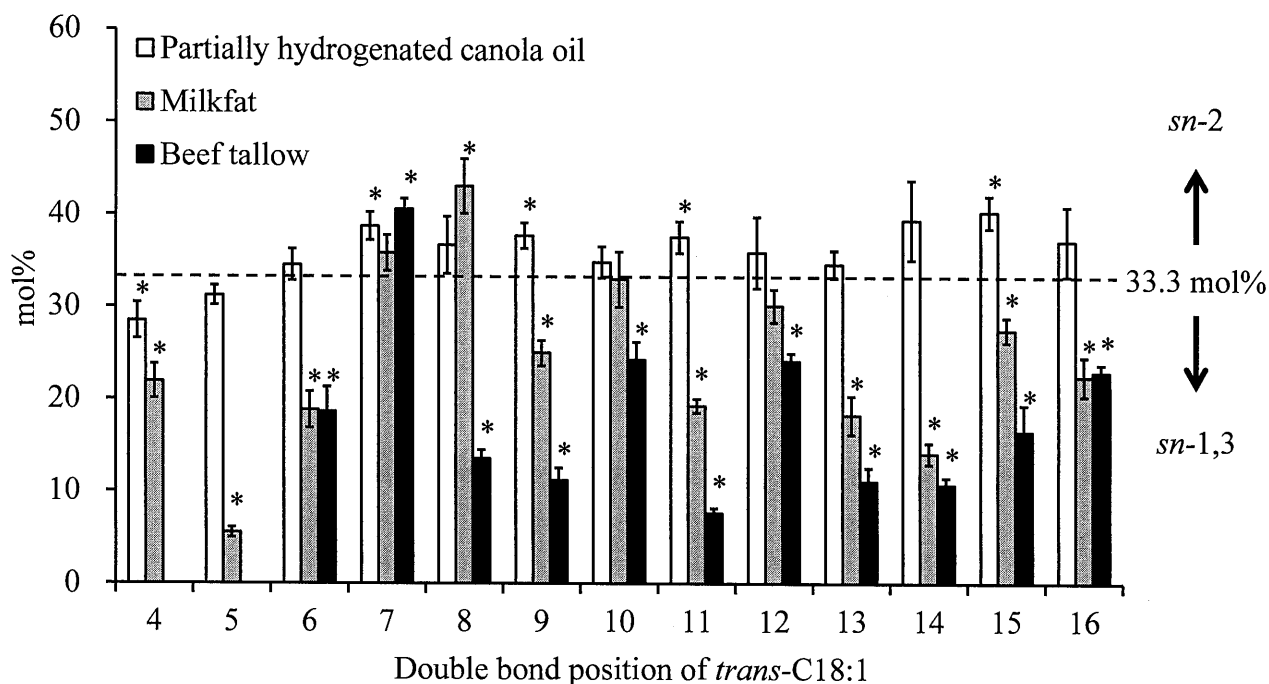


Figure 4.2

Regiospecificity of *trans*-octadecenoic acids at the *sn*-2 position of TAG

The dotted line (33.3 mol%) indicates the regiospecific value at which the fatty acid is equally distributed.

*Significantly different from 33.3 mol/100 mol ($P < 0.05$).

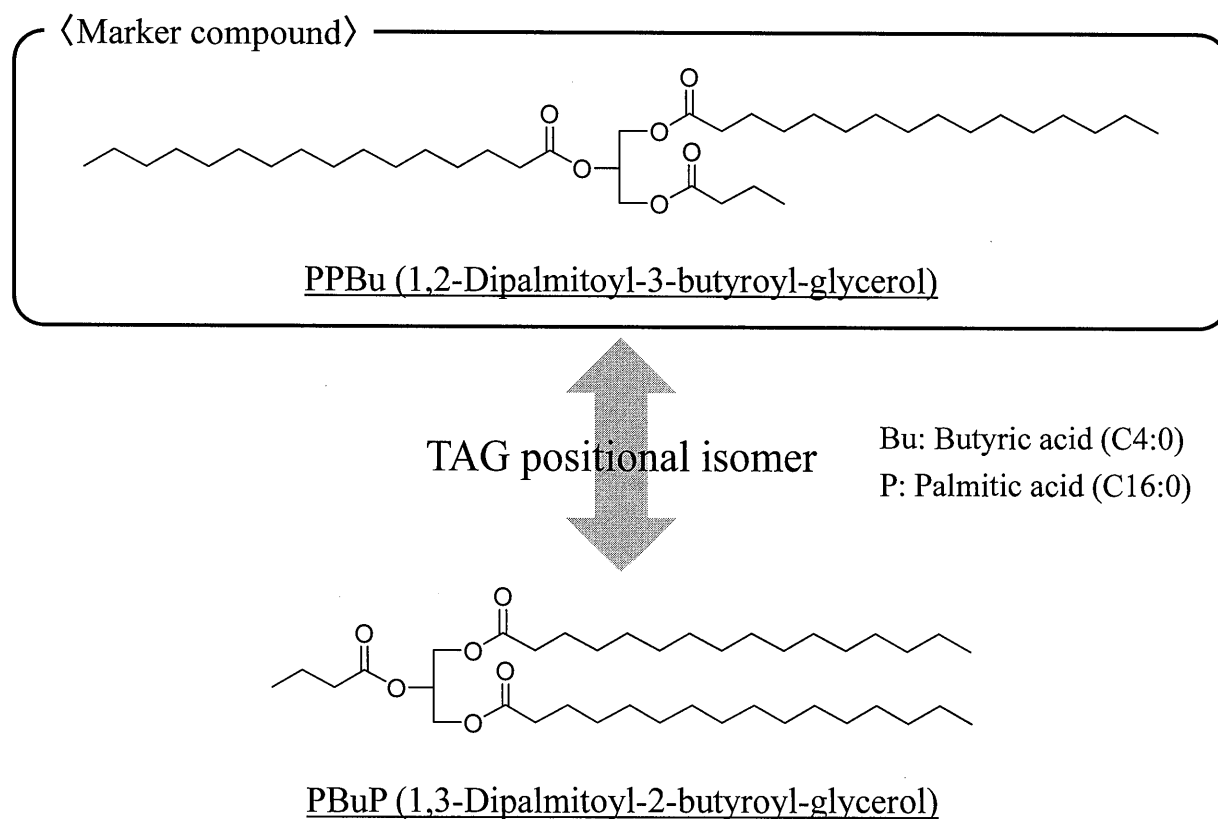


Figure 5.1

Chemical structure of triacylglycerol

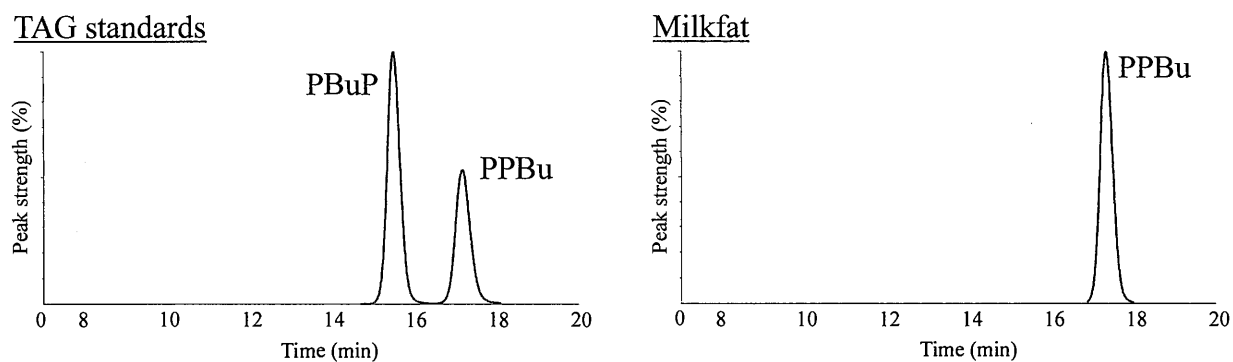


Figure 5.2
Chromatograms of TAG standards and milkfat

Table 5.1
Milk fat contents in butter-blended foods

	Experimental milk fat content (%)
Butter-blended margarine (Milkfat content 15%)	14.8 ± 0.3
Butter cookies (Milkfat content 10%)	9.6 ± 0.4

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	吉永 和明
審 査 委 員	主査：教授 齋藤 忠夫 副査：教授 駒井 三千夫、教授 池田 郁男
学 位 論 文 目 題	食用油脂における脂肪酸結合位置の分析法に関する研究

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

食用油脂の主成分であるトリアシルグリセロール(TAG)は、グリセロールの3箇所の水酸基に3つの脂肪酸がそれぞれエステル結合した化学構造をとる。TAG に結合する脂肪酸の結合位置は、決してランダムではなく、生物種により異なる。種々の保健機能を有する EPA や DHA などの n-3 系高度不飽和脂肪酸(n-3HUFA)は、結合位置により生理機能が異なることが推定されているが、心疾患など人体に悪影響を及ぼすと言われるトランス脂肪酸が TAG の結合位置と生理機能の関係を研究した例は非常に少ない。従来のトランス脂肪酸の研究がなかなか進まない原因として、従来のトランス脂肪酸分析法では、位置異性体の分離・定量が困難であることが第一に挙げられる。

そこで本研究では、従来の TAG 解析での種々の問題点を解決する新しい分析法の構築とその応用について研究を行った。

まず、TGA における n-3HUFA の結合位置と生理機能について C57BL/6J マウスへの投与実験により検討した。その結果、n-3HUFA である EPA や DHA の生理機能は、TAG における結合位

置により大きく影響を受けることが判明した。

ついで、食用油脂中のトランス脂肪酸の位置異性体の分析方法の開発を試みた。試験には、シス型およびトランス型オクタデセン酸位置異性体の標準品を用いて、現在の分析公定法で指定されている SP-2560 カラムと最新の超極性 SLB-IL111 カラムを用いて分析を行った。その結果、従来の分析法では分離させることが出来なかった *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体の全ての位置異性体をカラムの選択、分析温度条件(120℃と 160℃)などを最適化することで、部分水添油および乳脂肪に含まれる全てのトランス脂肪酸の位置異性体の分離・定量に初めて成功した。

さらに、種々の検討の結果、部分水添油の主要なトランス脂肪酸は、TAG の *sn* - 2 位に結合し、乳脂肪および牛脂の主要なトランス脂肪酸は、TAG の *sn* - 1,3 位に結合することを初めて明らかにすることができた。

また、LC-APCI-MS/MS を用いることで、食品中の乳脂肪含有量を簡便に推定する手法も確立させることができた。この方法では、乳脂肪の指標として、パルミチン酸2分子と酪酸から構成される TGA である 1,2-Dipalmitoyl-3-butyroyl-glycerol(PPBu)を用い、PBuP との相互分離を目指した。その結果、乳脂肪は PBuP をほとんど含まないことが判明した。従って、本分析法は非常に高い精度で、食品中の乳脂肪含量を推定でき、乳脂肪使用という食品表示の真實を見抜くことも可能となった。また、本分析手法は、乳脂肪のエステル交換の有無を判定することにも使用可能であった。

本研究で得られた知見は、真に人体に悪影響を及ぼすトランス脂肪酸位置異性体を特定し、食用油脂の安全性を担保するための将来の重要な基盤研究になることが十分に考えられた。

以上のことから、出席した審査員一同は、本論文提出者に対して、博士（農学）の学位を授与するに値するものと最終判定した。